

12.01.01

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 02 MAR 2001

WIPO PCT

E K U

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 1月17日

JP01/131

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-007993

出 願 人

Applicant(s):

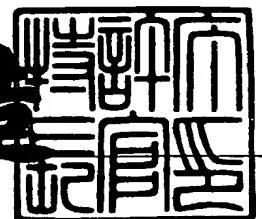
三井化学株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 2月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3007296

【書類名】 特許願
【整理番号】 31990122
【提出日】 平成12年 1月17日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07C233/09
C07C231/24

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 9 0 0 番地 三井化学株式会社内

【氏名】 阿部 剛也

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 番地 三井化学株式会社内

【氏名】 伊藤 潔

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 9 0 0 番地 三井化学株式会社内

【氏名】 佐々木 賢樹

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 9 0 0 番地 三井化学株式会社内

【氏名】 渡辺 清一

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 番地 三井化学株式会社内

【氏名】 浅野 保

【特許出願人】

【識別番号】 000005887

【氏名又は名称】 三井化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100075247

【弁理士】

【氏名又は名称】 最上 正太郎

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011833

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アミド化合物の精製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アミド化合物含有液を酸性条件下で活性炭と接触させることを特徴とするアミド化合物の精製方法。

【請求項 2】 アミド化合物含有液が、対応するニトリル化合物の水和反応により得られる生成液である請求項 1 に記載の精製方法。

【請求項 3】 アミド化合物が炭素数 2 ～ 2 0 のものである、請求項 1 または 2 に記載の精製方法。

【請求項 4】 アミド化合物が不飽和結合を有するものである、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の精製方法。

【請求項 5】 アミド化合物がアクリルアミドまたはメタクリルアミドである、請求項 1 または 2 に記載の精製方法。

【請求項 6】 アミド化合物が、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いて合成されたものである、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の精製方法。

【請求項 7】 微生物菌体が、微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体であることを特徴とする請求項 6 に記載の精製方法。

【請求項 8】 活性炭との接触時のアミド化合物含有液の pH が 3. 5 ～ 6. 5 である、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の精製方法。

【請求項 9】 酸解離指数 3. 5 ～ 5. 5 の有機酸、または該有機酸と塩基を用いてアミド化合物含有液を酸性に調製することを特徴とする、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の精製方法。

【請求項 1 0】 有機酸がアクリル酸またはメタクリル酸であることを特徴とする、請求項 9 に記載の精製方法。

【請求項 1 1】 活性炭が、木質またはヤシ殻を原料とした活性炭であることを特徴とする、請求項 1 ～ 1 0 のいずれかに記載の精製方法。

【請求項 1 2】 活性炭との接触時の温度が 1 0 ～ 5 0 ℃ である、請求項 1 ～

11のいずれかに記載の精製方法。

【請求項13】 アミド化合物含有液を活性炭と接触させた後、該液を飽和温度以下として結晶を析出させることを特徴とする、請求項1～12のいずれかに記載の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアミド化合物の精製方法に関するものであり、より詳しくは、アミド化合物の含有液を活性炭を用いて処理することにより、効率的に純度の高いアミド化合物を得る方法に関する。

【0002】

【従来技術】

アミド化合物、特にニトリル化合物を水和して得られるアミド化合物生成液中にはその製法により種類は異なるものの、通常は高分子物質や界面活性剤、着色分、溶出物、または他の不純物等が存在する。これらを除くために、例えば特開昭61-115495号公報および特公平2-9022号公報では活性炭による精製処理方法が、特開昭61-115058号公報ではイオン交換膜による精製処理方法が、また特公平5-49273号公報では多孔質中空糸膜による精製処理方法が記載されている。

【0003】

~~しかしながら、上記イオン交換膜や多孔質中空糸膜を用いた精製方法では特殊な精製機器が必要となる等、その実施において、経済性の面でのデメリットは避けられない。~~

【0004】

また、活性炭による精製方法においては、通常は特殊な設備は必要ないものの、得られる製品中には不純物が存在し、効果の点で未だ不十分なものとなっている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、アミド化合物含有液中に含まれる不純物を効率的に除去できる方法を提供することにある。より具体的にはニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する際に、該アミド化合物含有液を活性炭を用いて処理し、簡便でかつ効率的な精製方法を提供することを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前述のアミド化合物含有液の活性炭を用いた精製に関して鋭意検討を行なってきたところ、その精製を酸性条件下で行なうことにより、更には特定なpHの領域において活性炭と接触することにより、該アミド化合物含有液中に含まれる不純物が、極めて効率的に除去しうるものであることを見出した。

【0007】

特に従来知見では、アミド化合物が不飽和結合を持つもの（例えば産業上比較的重要な化合物であるアクリルアミド、メタクリルアミド等）は、酸性領域では重合反応が促進しやすく、化合物が不安定になってしまうことが知られており、これを避けるため、溶液を中性に保つことが重要とされてきた。このような観点からも、上記条件下による精製処理技術は従来技術から到底予想し得ないことであった。

【0008】

すなわち、本発明は、

- (1) アミド化合物含有液を酸性条件下で活性炭と接触させることを特徴とするアミド化合物の精製方法であり、また、
- (2) アミド化合物含有液が、対応するニトリル化合物の水和反応により得られる生成液である上記(1)に記載の精製方法であり、また、
- (3) アミド化合物が炭素数2～20のものである、上記(1)または(2)に記載の精製方法であり、また、
- (4) アミド化合物が不飽和結合を有するものである、上記(1)～(3)のいずれかに記載の精製方法であり、また、
- (5) アミド化合物がアクリルアミドまたはメタクリルアミドである、上記(1)または(2)に記載の精製方法であり、また、

(6) アミド化合物が、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いて合成されたものである、上記(1)～(5)のいずれかに記載の精製方法であり、また、

(7) 微生物菌体が、微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体であることを特徴とする上記(6)に記載の精製方法であり、また、

(8) 活性炭との接触時のアミド化合物含有液のpHが3.5～6.5である、上記(1)～(7)のいずれかに記載の精製方法であり、また、

(9) 酸解離指数3.5～5.5の有機酸、または該有機酸と塩基を用いてアミド化合物含有液を酸性に調製することを特徴とする、上記(1)～(8)のいずれかに記載の精製方法であり、また、

(10) 有機酸がアクリル酸またはメタクリル酸であることを特徴とする、上記(9)に記載の精製方法であり、また、

(11) 活性炭が、木質またはヤシ殻を原料とした活性炭であることを特徴とする、上記(1)～(10)のいずれかに記載の精製方法であり、また、

(12) 活性炭との接触時の温度が10～50℃である、上記(1)～(11)のいずれかに記載の精製方法であり、また、

(13) アミド化合物含有液を活性炭と接触させた後、該液を飽和温度以下として結晶を析出させることを特徴とする、上記(1)～(12)のいずれかに記載の精製方法である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明におけるアミド化合物含有液は特に限定されるものではなく、具体的には炭素数が2～20程度のニトリル化合物を水和し、得られるアミド化合物含有生成液であるものが挙げられる。特に、アクリロニトリルやメタクリロニトリル等のような、不飽和結合を持つニトリル化合物を水和することにより得られる、アクリルアミドやメタクリルアミドを含む水溶液に対して、本発明の精製方法は好適である。

【0010】

本発明において、処理の対象とされるアミド化合物含有液に関しては、既知のいずれの水和方法により得られたものであっても構わない。すなわち、硫酸による水和法や、ラネー銅触媒等の金属銅を含む触媒による接触水和法、ニトリル化合物を水和する能力を有する酵素（ニトリルヒドラーゼ）およびこれを含有する微生物菌体、それらの酵素および微生物菌体処理物等を用いて水和したもの等、いずれであっても構わない。

【0011】

なかでも、ニトリル化合物を水和する能力を有する酵素であるニトリルヒドラーゼ、ニトリルヒドラーゼの処理物、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、あるいは該微生物菌体の処理物等を用いて得られるアミド化合物含有液は、本発明の精製方法に好適である。

【0012】

また、上記におけるニトリルヒドラーゼとは、ニトリル化合物を加水分解して対応するアミド化合物を生成する能力をもつ酵素をいうものである。

【0013】

ここで、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物としては、ニトリル化合物を加水分解して対応するアミド化合物を生成する能力を有するニトリルヒドラーゼを産生し、かつ30質量%のアクリルアミド水溶液中でニトリルヒドラーゼの活性を保持している微生物であれば、特に制限されるものではない。具体的には、ノカルディア(Nocardia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、バ

チルス(Bacillus)属、好熱性のバチルス属、シュードモナス(Pseudomonas)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、ロドクロウス(rhodochrous)種に代表されるロドコッカス(Rhodococcus)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、キサントバクター(Xanthobacter)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、リゾビウム(Rhizobium)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、エルウィニア(Erwinia)属、エアロモナス(Aeromonas)属、シトロバクター(Citrobacter)属、アクロモバクター(Achromobacter)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属またはサーモフィラ(thermophila)種に代表されるシュードノカルディア(Pseudonocardia)属に属する微生物を好適な例として挙げる事ができ

る。

【0014】

また、該微生物よりクローニングしたニトリルヒドラターゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体も本発明でいう微生物に含まれる。なお、ここでいう任意の宿主には、後述の実施例のように大腸菌(*Escherichia coli*)が代表例として挙げられるが、とくに大腸菌に限定されるのものではなく枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。その様なものの例として、MT-10822 (本菌株は、1996年2月7日に茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5785として、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されている。)が挙げられる。また、組換えDNA技術を用いて該酵素の構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除もしくは挿入することにより、アミド化合物耐性やニトリル化合物耐性、温度耐性を更に向上させた変異型のニトリルヒドラターゼを発現させた形質転換体も、本発明でいう微生物に含まれる。

【0015】

上記に記載したような微生物を用い、アミド化合物を製造するに際しては通常、該微生物の菌体あるいは菌体処理物を用いる。菌体は、分子生物学・生物工学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を利用して調製すればよい。例えば、LB培地やM9培地等の通常液体培地に該微生物を植菌した後、適当な培養温度(一般的には、~~20℃～50℃であるが、好熱菌の場合は50℃以上でも~~よい。)で生育させ、続いて、該微生物を遠心分離によって培養液より分離・回収して得る方法が挙げられる。

【0016】

また、本発明における微生物の菌体処理物は、上記微生物菌体の抽出物や磨砕物、該抽出物や磨砕物のニトリルヒドラターゼ活性画分を分離精製して得られる後分離物、該微生物菌体や該菌体の抽出物・磨砕物・後分離物を適当な担体を用いて固定化した固定化物等を指し、これらはニトリルヒドラターゼの活性を有している限りは本発明の菌体処理物に相当するものである。

【0017】

本発明が精製の対象とするアミド化合物において、該アミド化合物を、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、あるいはその微生物菌体の処理物を用い、アミド化合物を得る場合の反応形式は、対応するニトリル化合物を回分反応に供する方法でもよいし、連続反応であってもよい。また、反応の形式も特に限定はなく、例えば懸濁床として行なってもよいし、固定床であってもよい。この際の反応液中での触媒、例えば微生物の菌体または菌体処理物の濃度は、水性媒体とニトリル化合物の混合に支障をきたさない限り、特に制限されるものではない。

【0018】

上記において、ニトリル化合物を反応開始時に添加する場合のニトリル化合物の濃度は、反応開始時において該ニトリル化合物の飽和濃度以上であればよい。一方、その濃度の上限は特に限定されるものではなく、想定する反応終了時のアミド化合物濃度およびニトリル化合物濃度により任意に決定すればよい。

【0019】

また、未反応のニトリル化合物は、反応後に蒸留等の手段により反応液より除去することもできる。よって、想定する反応終了時のアミド化合物濃度に達した時点でもニトリル化合物が過剰となるようにニトリル化合物を添加することもできる。

【0020】

~~具体的には、例えばニトリル化合物がアクリロニトリルである場合、水に対する~~
本化合物の飽和濃度は約7質量% (at 20℃) であるので、約7質量%以上が好適である。また、メタクリロニトリルまたはクロトンニトリルがニトリル化合物である場合、水に対するこれらの化合物の飽和濃度は約2質量% (at 20℃) であるので、約2質量%以上が好適である。

【0021】

上記におけるアミド化反応は通常は常圧下で行われるが、水性媒体中へのニトリル化合物の溶解度を高めるために加圧下で行うこともできる。また、反応温度に関しては、水性媒体の氷点以上であれば特に制限はされないが、触媒がニトリ

ルヒドラーゼを含む場合は、好ましくは $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $10 \sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲内で行われる。

【0022】

また、上記におけるアミド化反応時の反応液の pH は、ニトリルヒドラーゼ活性が維持されている限りは特に制限するものではないが、好ましくは $\text{pH} 6 \sim 10$ の範囲、より好ましくは $\text{pH} 7 \sim 9$ の範囲である。

【0023】

次に、本発明におけるアミド化合物の精製は、アミド化合物を含有する液を酸性下において活性炭と接触させることにより行うものであり、アミド化合物含有液として、好ましくは $\text{pH} 2$ 以上、更により好ましくは $\text{pH} 3.5 \sim 6.5$ の範囲にて行なう。

【0024】

本発明において、アミド化合物含有液を酸性とするには通常、該アミド化合物含有液に酸を添加する必要があるが、その酸の種類としてはアミド化合物の安定性に影響を与えるものでなければ広い範囲のものが使用でき、例えば硫酸や硝酸等のような鉱酸、あるいは酢酸やアクリル酸のようなカルボン酸および有機酸等が挙げられ、二種以上が用いられても構わない。これらのうちでも、本発明では、より pH 調製が容易でかつ安定し、しかもより高い精製効果および化合物の安定性を得る上から弱酸の使用が効果的であり、更には pH 緩衝効果をも持たせる上から、弱酸と塩基との両方を用いて上記酸性条件下に調製することが、非常に好ましい。

【0025】

上記弱酸としては、 pH 制御範囲を考慮すると、酸解離指数 (pK_a ; 25°C 、水中) が $2.0 \sim 6.0$ のもの、更には $3.5 \sim 5.5$ であるものがより好ましい。これら酸の代表的なものとしては酢酸、プロピオン酸、オクタン酸、吉草酸等の脂肪族飽和モノカルボン酸、アクリル酸、クロトン酸、メタクリル酸等の脂肪族不飽和モノカルボン酸、シュウ酸、アジピン酸、コハク酸、マレイン酸等の脂肪族ポリカルボン酸、安息香酸等の芳香族カルボン酸等が挙げられる。また、上記塩基としては強塩基であるものが好ましく、水酸化ナトリウムや水酸化カ

リウム等が挙げられる。

【0026】

また本発明において、処理の対象とするアミド化合物が、特に不飽和結合を持つようなものである場合は、製品後にそれが重合反応に供される際に、該重合物中に酸が残存、あるいは遊離したりする不都合を生ずることになる。このため、上記のようなアミド化合物が精製対象となる場合は、酸としては不飽和結合を有するものであってかつ、当該アミド化合物と共重合することが可能なもの、具体的にはアクリル酸やメタクリル酸、あるいはクロトン酸等を使用することが好ましい。

【0027】

本発明において、上記酸、または上記酸と塩基の濃度としては、アミド化合物含有液の性状および用いる酸の pK_a にもよるが、酸換算でアミド化合物含有液に対し、通常 10 質量 ppm ～ 5 質量 % の範囲である。

【0028】

また、本発明では上記した酸性条件下に該アミド化合物含有液を活性炭と接触させるが、活性炭と接触している際にアミド化合物含有液が酸性となっている、あるいは酸性とする形態であれば特に限定はなく、活性炭の添加と同時にアミド化合物含有液を酸性下に調製する方法であっても何ら構わない。

【0029】

本発明で使用する活性炭については特に限定はなく、粉状および粒状のいずれであっても使用することができる。また、精製処理を行う装置においても、用いる活性炭の粒度に適したものをを用いればよい。例えば粉状活性炭を用いる場合は、液の攪拌が可能な槽において、回分式および連続式のいずれでも実施することができる。また、粒状活性炭を用いるような場合は、上記形式の他に、充填塔形式による連続処理も可能である。

【0030】

また、上記活性炭および処理の形式については、アミド化反応に用いた触媒、例えば微生物菌体やその処理物の性状に応じて、適切な形式を選ぶことができる。また、活性炭には一般的には、原料として石炭、木、およびヤシ殻等を用いた

もの等があるが、吸着能を有するものであれば特段の限定はなく、いずれのものであっても使用することは可能である。

【 0 0 3 1 】

しかしながら、処理の対象とするアミド化合物が特に不飽和結合を有するものである場合は、該アミド化合物の保存安定性や重合反応等を考慮すると、活性炭としては金属分含有量の少ないものを使用することが好ましく、原料が木質のもの、またはヤシ殻のものを使用することがより好ましい。

【 0 0 3 2 】

本発明において、アミド化合物を精製処理する際に使用する活性炭量は、あまり少ない場合は十分な精製効果を得ることが困難であり、またあまり多く使用しても不経済となることから、その使用量としてはアミド化合物含有液に対して、通常 0.01～20 質量%の範囲、より好ましくは 0.05～10 質量%の範囲である。

【 0 0 3 3 】

また、活性炭として特に粉状のものをを用いる場合、該活性炭はアミド化合物含有液中にそのまま直接添加してもよく、または一旦、活性炭を水等の媒体中に分散させ、スラリー状としたものをアミド化合物含有液に添加、あるいは供給するようにしてもよい。

【 0 0 3 4 】

本発明において、活性炭によりアミド化合物含有液を精製処理する際の温度は、~~アミド化合物の結晶が析出せずに、かつその安定性に影響のない範囲であれば~~特に制限はないが、通常は 0～80℃の範囲で行われる。特にアクリルアミドやメタクリルアミド含有液のような、不飽和結合を有するアミド化合物含有液を精製処理する場合は、重合反応生起によるゲル化を防止するために 60℃以下、更には 10～50℃の範囲にて、活性炭と接触させることが好ましい。また、活性炭との接触処理に要する時間は、処理形式や活性炭の量にも左右されて一定しないが、通常は 0.5～20 時間の範囲である。

【 0 0 3 5 】

次いで、本発明では上記接触処理したアミド化合物含有液から活性炭を分離し

、該アミド化合物含有液の精製液を得る。活性炭を分離する方法としては、一般に用いられる固液分離装置のものであれば特に限定はなく、例えば加圧濾過器、減圧濾過器、または遠心分離器等があげられ、更には回分式および連続式のいずれであっても構わない。

【0036】

また、本発明においては上記活性炭を分離した後のアミド化合物含有液を冷却し、液中より目的のアミド化合物を晶析させるという方法を採用することにより、更なる精製されたアミド化合物を得ることも可能である。

【0037】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。以下において、反応液のHPLC分析は、HPLCカラムとしてULTRON 80HG (50×8φmm)を用い、10mMリン酸水溶液を展開液として使用したものであり、アクリルアミドは220nmの吸光度により検出したものである。また、本発明の効果を確認するために、得られたアミド化合物含有液中に含まれるタンパク質を分析した。タンパク質濃度については、それに含まれるアミド化合物を半透膜により透析除去した後、バイオラット社製タンパク質分析キットを用いて定量し、タンパク質除去率を求めたものである。

【0038】

実施例1

500mlのバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地100mlを調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が50μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822株(FERM BP-5785)を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて20時間培養した。遠心分離(15000G×15分間)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

培地組成 酵母エキストラクト

5.0g/L

| | |
|-------------|-----------|
| ポリペプトン | 10.0 g/L |
| NaCl | 5.0 g/L |
| 塩化コバルト・六水和物 | 10.0 mg/L |
| 硫酸第二鉄・七水和物 | 40.0 mg/L |
| pH 7.5 | |

【0039】

上記で得られた湿菌体 1.5 g を 98.5 g の 0.3 mM-NaOH 水溶液に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 36 g 一括添加して、10℃にて攪拌を行いながら反応した。反応開始から 24 時間後に HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在（濃度 = 35 質量%）しており、アクリロニトリルは認められなかった。

【0040】

この反応液に対し、10%硫酸水溶液で pH を 5 に調整し、反応液に対し 2% の活性炭（三倉化成（株）製 粉末活性炭 PM-SX）を添加し、25℃で 5 時間攪拌を行ったあと、濾紙にて濾過を行った。得られた濾液中のタンパク質濃度を測定したところ除去率 99% 以上であった。

【0041】

実施例 2

実施例 1 で得られた反応液に対し、10%アクリル酸水溶液で pH を 5 に調整した以外は、実施例 1 と同様の処理を行い濾液を得た。濾液中のタンパク質濃度を測定したところ除去率 99% 以上であった。

【0042】

実施例 3

ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得

αサブユニットの 6 番目の Leu を Met に置換するために、特開平 9-275978 で得られた pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的に

キットの原理および操作方法を踏襲した。

【0043】

30 ml の試験管に10 ml のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにアンピシリンを添加した後、実施例1と同様にMT-10822株を一白菌耳植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養液1 mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000 rpm×5分)により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりpPT-DB1のプラスミドDNAを調製した。

【0044】

pPT-DB1のプラスミドDNA 1 μg を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号1記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号2に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 μl の系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号3に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号4に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 μl の系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μl を用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0質量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100(宝酒造社製)を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマーおよびdNTPを除去した後、TEを加えて各々50 μl の溶液を調製した。該TE溶液を各0.5 μl ずつ含む全量47.5 μl のアニーリング溶液(組成はキットに記載の条件による)を調製し、熱変性処理(98℃)を10分間行った後、37℃まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37℃で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTAKARA LA Taqを0.5 μl 加えて72℃で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成

させた。これにM13プライマーM4（配列表の配列番号2に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号4に配列を記載）を各々50 pmol加えて全量を50 μ lとした後、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応No. 3を行った。PCR反応No. 3の反応終了液5 μ lを用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8質量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2.0 kbpの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約2.0 KbpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して常法に従ってフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのTEに溶解した。精製した約2.0 kbpの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのTEに溶解した。同様に、pPT-DB1上の唯一の制限酵素サイトであるEcoRIおよびHindIIIによりpPT-DB1を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約2.7 KbpのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのTEに溶解した。この様にして得られた増幅DNA産物とpPT-DB1断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、大腸菌バンクを調製した。

【0045】

30 mlの試験管に40 μ g/mlの硫酸第二鉄・七水和物及び10 μ g/mlの塩化コバルト・二水和物を含む10 mlのLB液体培地（以後、活性発現培

地と呼ぶ)を調製し、 $121^{\circ}\text{C} \cdot 20$ 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにアンピシリンを添加した後、該大腸菌バンクより任意に選別した5クローンを各一白菌耳ずつ植菌し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 300\text{rpm}$ にて約20時間培養した。該培養終了液 1ml をそれぞれ適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離($15000\text{rpm} \times 5$ 分)により菌体を分離した。該菌体を $200\mu\text{l}$ のリン酸カリウムバッファー($\text{pH}7.0$)に懸濁し、これに1質量%のアクリロニトリルを添加して 10°C で2分間反応させた。反応液にこれと等量の 1M リン酸水溶液を添加して反応を停止させ、生成したアクリルアミド濃度を実施例2と同様のHPLC分析により測定した。その結果、5クローン中4クローンでアクリルアミドの生成が検出され、ニトリルヒドラーゼ活性を保持していることが確認された。

【0046】

ニトリルヒドラーゼ活性の測定に供した上記培養液の残部 1ml より該4クローンの菌体をそれぞれ分離し、アルカリSDS抽出法により各クローンのプラスミドDNAを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたプライマーエクステンション法により各クローンのニトリルヒドラーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、表1に示したクローンNo. 1においてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがMetに置換されていた。

【0047】

【表1】

| クローン番号 | 変 異 箇 所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置 換 前 | 置 換 後 | 置 換 前 | 置 換 後 |
| No. 1 | α -6番目 | Leu | Met | CTG | ATG |

続いて、 α サブユニットの126番目のPheをTyrに置換するために、クローンNo. 1のプラスミドDNAを鋳型として、上述と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0048】

すなわち、30 mlの試験管に10 mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られたクローンNo. 1株を一白菌耳植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養液1 mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 1株のプラスミドDNAを調製した。

【0049】

このクローンNo. 1株のプラスミドDNA 1 μ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 4は、配列表の配列番号5記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号2に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 5は、MUT4プライマー（配列表の配列番号3に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号4に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 4と同様の操作により行った。PCR反応No. 4およびNo. 5の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0質量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、クローンNo. 1の場合と全く同じ操作により大腸菌バンクを調製した。

【0050】

該大腸菌バンクより任意に選別した5クローンをクローンNo. 1の場合と同じ活性発現培地10 mlに各一白菌耳ずつ植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養終了液1 mlをそれぞれ適当な遠心チューブに分取した後、ニトリルヒドラターゼ活性を測定した。その結果、5クローン中4クローンでアクリルアミドの生成が検出され、ニトリルヒドラターゼ活性を保持していることが確認された。

【0051】

ニトリルヒドラターゼ活性の測定に供した上記培養液の残部 1 ml より該 4 クロンの菌体をそれぞれ分離し、アルカリ SDS 抽出法により各クロンのプラスミド DNA を調製した。続いて、クローン No. 1 の場合と同様の操作により各クロンのニトリルヒドラターゼ構造遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、表 2 に示したクローン No. 2 においてニトリルヒドラターゼの α サブユニットの 6 番目の Leu が Met に、 α サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0052】

【表 2】

| クローン番号 | 変 異 箇 所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩 基 配 列 の 変 化 | |
|--------|--------------------------------|-----------|-------|---------------|-------|
| | | 野 生 型 | 変 異 体 | 野 生 型 | 変 異 体 |
| No. 2 | α -6 番目 | Leu | Met | CTG | ATG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

続いて、 β サブユニットの 212 番目の Ser を Tyr に置換するために、クローン No. 2 のプラスミド DNA を鋳型として、上述と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0053】

すなわち、30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、得られたクローン No. 2 株を一白菌耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 1 株のプラスミド DNA を調製した。

【0054】

このクローン No. 2 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の PCR

反応を行った。PCR反応No. 6は、配列表の配列番号6記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号2に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 7は、MUT4プライマー（配列表の配列番号3に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号4に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 6と同様の操作により行った。PCR反応No. 6およびNo. 7の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0質量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、クローンNo. 1の場合と全く同じ操作により大腸菌バンクを調製した。

【0055】

該大腸菌バンクより任意に選別した5クローンをクローンNo. 1の場合と同じ活性発現培地10 mlに各一菌耳ずつ植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養終了液1 mlをそれぞれ適当な遠心チューブに分取した後、ニトリルヒドラーゼ活性を測定した。その結果、5クローン中4クローンでアクリルアミドの生成が検出され、ニトリルヒドラーゼ活性を保持していることが確認された。

【0056】

~~ニトリルヒドラーゼ活性の測定に供した上記培養液の残部1 mlより該4ク~~
 ローンの菌体をそれぞれ分離し、アルカリSDS抽出法により各クローンのプラスミドDNAを調製した。続いて、クローンNo. 1の場合と同様の操作により各クローンのニトリルヒドラーゼ構造遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、表3に示したクローンNo. 3においてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの212番目のSerがTyrに置換されていた。

【0057】

【表 3】

| クローン番号 | 変 異 箇 所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩 基 配 列 の 変 化 | |
|--------|------------------|-----------|-------|---------------|-------|
| | | 野 生 型 | 変 異 体 | 野 生 型 | 変 異 体 |
| No. 3 | α -6 番目 | Leu | Met | CTG | ATG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |
| | β -212 番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

このクローン NO. 3 の菌体を実施例 1 と同様に培養し、反応に必要な菌体を得た。

【0058】

更に、得られた湿菌体 1.5 g を 98.5 g の 0.3 mM-NaOH 水溶液に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 60 g 一括添加して、10℃にて攪拌を行いながら反応した。反応開始から 24 時間後に HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在（濃度＝50 質量％）しており、アクリロニトリルは認められなかった。

【0059】

この反応液に対し、10%硫酸水溶液で pH を 5 に調整し、反応液に対し 2% の活性炭（三倉化成（株）製 粉末活性炭 PM-SX）を添加し、25℃で 5 時間攪拌を行ったあと、濾紙にて濾過を行った。得られた濾液中のタンパク質除去率を測定したところ、除去率 99% 以上であった。

【0060】

実施例 4

反応液に対し、10%硫酸水溶液で pH を 3 に調整した以外は、実施例 1 と同様の処理を行い濾液を得た。濾液中のタンパク質除去率を測定したところ除去率 25% であった。

【0061】

比較例 1

反応液に対し、10%硫酸水溶液で pH を 7 に調整した以外は、実施例 1 と同

様の処理を行い濾液を得た。濾液中のタンパク質除去率を測定したところ除去率75%であった。

【0062】

【発明の効果】

以上の説明、特に上記実施例および比較例の結果からも明らかなように、本発明の方法によれば、従来の活性炭による精製方法に比べ、酸性下で活性炭と接触させることにより、遙かに効果的にアミド化合物の精製を行うことが可能となる。

【配列表】

<110> Mitsui Chemicals Inc.
 <120> Method of purification for amide products.
 <130> 31990122
 <141> 2000-1-17
 <160> 6

 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 1
 aacatcatgc gcaagtcg

18

<210> 2
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400>2

caggaaacag ctatgac

17

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>3

ggccagtgcc tagcttacat

20

<210>4

<211>17

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>4

gttttcccag tcacgac

17

<210>5

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>5

aactggtaca aggagccg

18

<210>6

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>6

ccgaactaca gcgtctac

18

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アミド化合物含有液中に含まれる不純物を効率的に除去する方法を提供する。

【解決手段】 アミド化合物含有液を、酸性の条件下において、活性炭と接触処理することを特徴とする。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日

1997年10月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

氏 名

三井化学株式会社

